

Tartu Ülikool

Loodus- ja tehnoloogiateaduskond

Keemia Instituut

Kaieli Tohvert

Orbretseptor GPR155 lokalisatsiooni määramine
roti ajus *in situ* hübridisatsiooni abil

Magistritöö

Juhendaja: PhD Ain Uustare

Tartu 2013

1. Sisukord

1. Sisukord	2
2. Kasutatud lühendid	3
3. Sissejuhatus.....	4
4. Kirjanduse ülevaade.....	5
4.1 G-valguga seotud retseptorid.....	5
4.2 Orbretseptorid.....	5
4.3 GPR155	6
4.4 GPR155 mRNA lokaliseerimine ja arvatavaid funktsioone	6
4.5 <i>In situ</i> hübridisatsioon	7
4.6 Uudistamisaktiivsuse määramine rottidel uudiskasti meetodil	9
4.7 Immunohistokeemia	9
5. Praktiline osa.....	11
5.1 Materjalid.....	11
5.2 Riboproovid.....	11
5.3 Loomade selekteerimine uudiskasti meetodil.....	11
5.4 Ajude perfuseerimine paraformaldehüüdiga ja lõikamine	12
5.5 <i>In situ</i> hübridisatsioon ujuvlõikudel	13
6. Tulemused.....	15
6.1 Kontrollkatse	15
6.2 Sõelung läbi kogu roti aju.....	17
6.3 Võrdlus Immunohistokeemiast saadud tulemustega	20
6.4 GPR155 lokaliseerimise erinevused kõrge ja madala uudistamisaktiivsuse korral ...	22
7. Arutelu	23
8. Kokkuvõte.....	24
9. Kasutatud kirjandus	25
10. Localization of orphan receptor GPR155 in rat brain with <i>in situ</i> hybridization.....	27
11. Lisad	28
12. Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	29

2. Kasutatud lühendid

BM – purple – *ingl.k. alkaline phosphatase substrate, precipitating* ehk aluselise fosfataasi sadenev substraat

BR – *ingl.k. blocking reagent* ehk blokeerimis reagent

DIG – digoksügeeniin

GPR155 – G-valguga seotud retseptor 155

MQ – MilliQ vesi, ultrapuhas vesi tüüp 1

NTMT – *ingl.k. alkaline phosphatase buffer* ehk aluselise fosfataasi puhver (NaCl-Tris-Cl-MgCl₂-Tween20)

PBS – *ingl k. phosphate buffered saline* ehk fosfaatpuhverdatud soolalahus

PFA – paraformaldehüüd

RNA – ribonukleiinhape

SSC – *ingl.k. saline sodium citrate* ehk naatriumtsitraadi soolalahus

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat

TBST – *ingl.k. Tris buffered saline with Tween* ehk TRIS-puhverdatud soolalahus Tweeniga

TRIS – 2-amino-2-(hüdroksumetüül)-1,3-propaandiool

3. Sissejuhatus

G-valguga seotud retseptorid on üks kõige suuremaid retseptorite perekondi. Olles märklauaks paljudele ravimitele, pakuvad G-valguga seotud retseptorid laialdast huvi. Samas leidub nende hulgas palju selliseid retseptoreid millele pole veel tuvastatud aktivaatoreid. Selliseid ligandita retseptoreid kutsutakse orbreseptoriteks ja nende uurimine ja neile sobivate ligandide leidmine on järjest populaarsem. Esimeseks sammuks sobiva ligandi leidmisel on orbreseptori asukoha tuvastamine organismis. Antud töös sellest etapist juttu tulebki.

Käesolevas magistritöös antakse lühiülevaade nii G-valguga seotud retseptorite, orbreseptorite kui ka G-valguga seotud retseptor 155 (GPR155) kohta. Samuti käsitletakse erinevaid meetodeid retseptorite lokaliseerimiseks roti ajus, ning antakse ülevaade käitumisomaduste uurimisvõimalusest uudiskasti testiga. Käesoleva töö põhirõhk on GPR155 lokaliseerimise tuvastamisel *in situ* hübriidiseerimise abil.

Töö eksperimentaalne osa keskendub tehtud katsetele, mille eesmärk oli lokaliseerida GPR155 lokaliseerimine roti ajus, mille alusel saaks edaspidi tuvastada võimalikke funktsioone.

4. Kirjanduse ülevaade

4.1 G-valguga seotud retseptorid

G-valguga seotud retseptorid (GPCR) on transmembraansete valkude klass, mis osalevad keemilisel signaali ülekandel rakumembraanil. Endogeensetele signaalidele reageerivate GPCR-de hulgas on suur hulk retseptoreid, mille kuulumine sellesse klassi on oletatud vastava geeni järjestusest, aga millele vastavat endogeenset aktiveerijat (agonisti) pole leitud. Neid nimetatakse orbreseptoriteks, aastal 2006 oli orbreseptorite hulk umbes 120 (Oh *et al.* 2006).

IUPHAR nomenklatuuri järgi jagatakse GPCR-d kolme perekonda: A, B ja C. Perekonna B võib jagada kaheks küllaltki suure erinevusega grupiks – sekretiinilaadseteks retseptoriteks, mille hulka kuuluvad mitmesuguseid peptiidseid hormoone siduvad retseptorid ja adhesioonireseptoriteks, mille ligandid ja signaaliülekandete on ebaselged (Fredriksson *et al.* 2003). GPR155 on (mRNA järjestuse põhjal) oletatud kuuluma perekonda B; järjestus on rohkem homoloogiline adhesioonireseptorite grupiga (Vassilatis *et al.* 2003), kuid homoloogia on siiski väga väike, et GPR155 sellesse gruppi kuuluvaks liigitada (Oh *et al.* 2006). Kuna GPR155-le pole leitud endogeenset aktiveerijat on tegemist orbreseptoriga.

4.2 Orbreseptorid

Olgugi, et G-valguga seotud retseptoreid on väga palju pole kõigile neile veel leitud kehaomaseid ligande. Selliseid ligandita retseptoreid nimetatakse orbreseptoriteks. Orbreseptorite kuulumine G-valguga seotud retseptorite klassi on määratud geenijärjestuse põhise homoloogia alusel (Im 2002). Homoloogia järgi võib orbreseptori lugeda teatud klassi kuuluvaks kui vähemalt 40% järjestusest on sarnane antud gruppi kuuluvate retseptoriga.

Retseptorid vastutavad erinevate signaalide jõudmise eest sihtkohtadesse. Üldjuhul on võimalik uurida retseptorite poolt vahendatud signaaliülekannet kasutades selleks antud retseptoritele omaseid ligande ehk siis kas aktiveerijaid või deaktiveerijaid. Kuna orbreseptoritele pole veel tuvastatud endogeenseid ligande ja samuti puudub info nende funktsioonide kohta, peetakse neid potentsiaalseteks ravimimärklaudadeks. Selletõttu pälvib

deorvustamine ehk endogeensete aktiveerijate leidmine järjest enam tähelepanu. (Civelli *et al.* 2006, Ma *et al.* 2002).

4.3 GPR155

G-valguga seotud retseptor 155 (GPR155) on üks kõige vähem uuritud orbreseptoreid. GPR155 uurimise kohta on vaid mõned kirjandusviited, mis seovad seda autismi, UV-kiirgusest tingitud kasvaja ja parasiitide poolt põhjustatud põletikega (Nishimura *et al.* 2007, Hacker *et al.* 2008, Albuquerque *et al.* 2009). GPR155 (alias PGR22) on membraani läbiv valk ning geeni homoloogia põhjal liigitatakse see G-valguga seotud retseptorite hulka (GPCR). G-valguga seotud retseptorite hulgas liigitatakse GPR155 homoloogia põhjal sekretiini laadsete retseptorite hulka. Sekretiini laadsed retseptorid vastutavad näiteks põhiliste füsioloogiliste funktsioonide nagu ekso- ja endokriinne sekretsioon reguleerimise, toitumisharjumuste, metabolismi, kasvu ja neuromodulatsioonide eest. (Neumann *et al.* 2008)

GPR155 geeni pikkus on 4810 aluspaari (http://www.genscript.com/cgi-bin/orf/refseq.pl?acc=NM_001107811). Roti ja hiire GPR155 aminohappeline järjestus on 95% ulatuses sarnane (Trifonov *et al.* 2010).

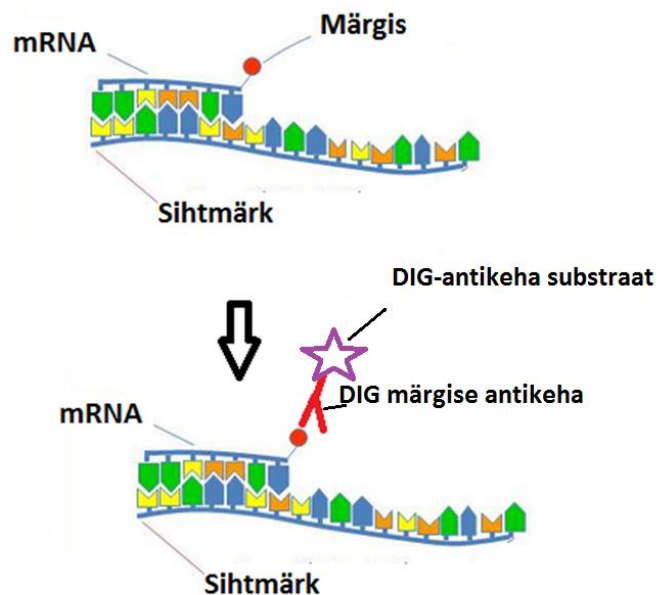
4.4 GPR155 mRNA lokalisatsioon ja arvatavaid funktsioone

RT-PCR meetodil määrati GPR155 ekspressiooni mitmetes ajuosades. GPR155 ekspressiooni leiti hüpotaalamuses, amügdalas (mandelkeha), ajutüves, väikeajus, ajukoos, frontaalkoores, hippokampuses, juttkehas ja taalamuses. Kõige kõrgem mRNA tase leiti juttkehas ja taalamuses (Vassilatis *et al.* 2003). Kahte viimast ajuosa seostatakse motivatsiooni ja hüvekäitumisega. Kuid GPR155 ei ekspresseeru ainult aju, antud uuringus näidati selle geeni ekspressiooni ka perifeersetes kudedes (sh soolestik, neerud, kopsud, munasarjad, eesnäärme, nahk, magu ja emakas). Lisaks on leitud otsene seos GPR155 düsregulatsiooni ja autismi vahel. Autismi spektri häiritega loomadel on antud orbreseptori ekspressioon düsreguleeritud erinevalt loomadest, kellel antud häireid pole. (Nishimura *et al.* 2007). Siiani on kaardistatud GPR155 asukohad hiire aju (Trifonov *et al.* 2010)

Orbretseptor GPR155 sattus meie huviorbiiti seoses depressiooni loomudelite uurimisega. Loomudelina kasutati Wistar tõugu rotte, kes olid eelnevalt jagatud uudistamisaktiivsuse järgi gruppideks. Uudistamisaktiivsus määrati nn uudiskasti testis (vt allpool), kus Wistari liini rotid jagunevad selgelt rohkem (HE) ja vähem (LE) uudistavateks isenditeks, kusjuures vähem uudistavad rotid näitavad ülesse ärevamat käitumist mõnedes stressirohketes katsetes ning erinevad HE-rottidest ka hedoonilistele elamustele vastuvõtlikkuse kontekstis (Mällo *et al* 2007). Uudiskasti meetodil selekteeritud rottide geenide ekspressioonimustri analüüsil mRNA kiibil leiti, et orbretseptor GPR155 mRNA hulk erineb oluliselt LE ning HE rottide vahel erinevates ajuosades (hipokampuses, raphe tuumas). Lisaks nähti väiksemaid muutusi veel mitme orbretseptori ja serotonergilise signaaliülekanne komponentide ekspressioonitasemes (Projekti Newmood publitseerimata andmed). Lisaks avaldamata andmetele orbretseptorit GPR155 kohta, uuritakse seda retseptorit järjest rohkem.

4.5 *In situ* hübridisatsioon

In situ hübridisatsioon põhineb komplementaarse RNA-proovi (riboproovi) seostumisel koelõigus olevale retseptori mRNA-le. Seotav RNA proov on märgistatud antikehade poolt äratuntava fragmendiga, mis võimaldab hiljem seotunud mRNA värvireaktsiooni abil lokaliseerida. Lisaks antikehade poolt äratuntavale digoksügeniinile kasutatakse riboproovide märgistamiseks radioaktiivsete isotoopidega märgistatud proove. Digoksügeniiniga (DIG) märgistamise eeliseks räägib see, et pole vaja töötada radioaktiivsusega ja fakt, et seda toodetakse taimsest allikast (sõrmkübaralistest). Taimsest allikast pärit märgise korral on



Joonis 1: Skemaatiline *in situ* hübridisatsiooni toimumine. Sihtmärgiks olevale RNA-le seotub sellega komplementaarne mRNA, millele on seotud digoksügeniin märgis (ülemine pool). Peale ahelate seostumist seotakse digoksügeniinile antikeha, millel on aluseline fosfataas küljes, ja tehakse antikeha asukoht kindlaks aluselisele fosfataasile mõjuva substraadiga.

välditud taustaprobleemid teiste organismide rakkudes (Braissant *et al* 1998, Hart *et al* 2009). *In situ* hübridisatsiooni kasutatakse laialdaselt erinevate retseptorite asukoha tuvastamiseks. Eriti leiab see meetod kasutust orbreseptorite korral, kus on teada neist vaid geeni järjestus. (Farquharson *et al* 1990)

Joonisel 1 on toodud *in situ* hübridisatsiooni toimumine skemaatilisel. Olemasolevale sihtmärk RNA-le seostub sellega komplementaarne riboproov, mille küljes on antikehade poolt äratuntav märgis (antud juhul digoksygeeniin). Märgisele omakorda seostub katse käigus aluselise fosfataasiga konjugeeritud antikeha, mis muudetakse nähtavaks aluselise fosfataasi substraadi abil.

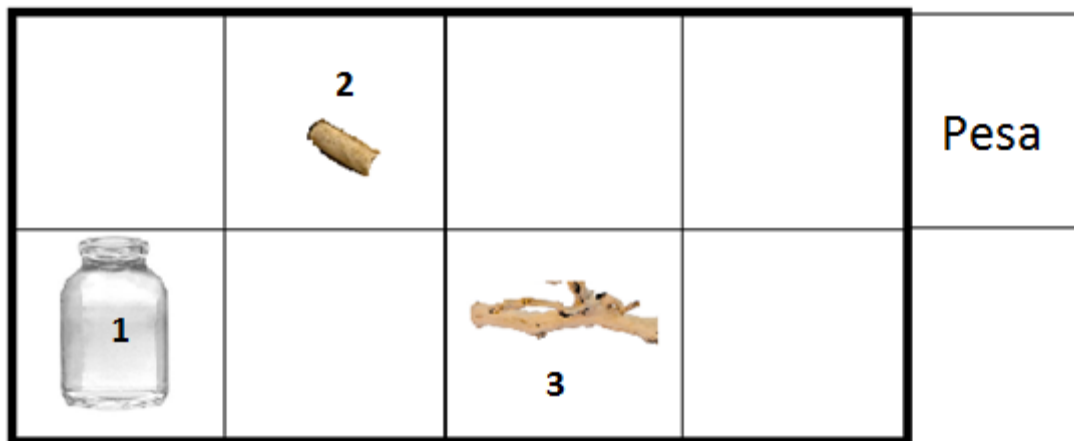
In situ hübridisatsiooni läbiviimine eksperimentaalselt on võimalik kahel erineval viisil. Esimene variant on teostada katse klaasidele (mikroskoobi slaidid) kinnitatud proovidega (lõikudega), teine võimalus on kasutada ujuvlõikude meetodit. Esimest varianti kasutatakse juhul kui katseobjekt on äärmiselt väike ning selle leidmine katseplaadilt on keerukas (näiteks hiire munasarjad). Kui aga uuritav objekt on vähegi suurem (näiteks hiirte või rottide ajud) on ujuvlõikude meetod igati teretulnud. Viimane võimaldab läbi töödelda korraga suuremat hulka proove ja katse teostamine katseplaadil on tehtud võimalikult lihtsaks. Lisaks on mõlemad meetodid omavahel võrreldavad – mõlema puhul toimub lõplik analüüs mikroskoobi klaasidel olevate proovidega. Antud töös kasutati ujuvlõikude meetodit. (Trifonov *et al* 2009, 2010, 2012, Braissant *et al* 1998, Owens *et al* 2006).



Joonis 2: Joonisel on kõrvutatud 12-süvendiga katseplaati ja mikroskoobi slaidi. 12-süvendiga katseplaadi puhul on võimalik korraga läbi töödelda suurem kogu proove.

4.6 Uudistamisaktiivsuse määramine rottidel uudiskasti meetodil

Öeldakse, et niipalju kui on erinevaid inimesi on ka erinevaid iseloomu. Sama võib ka väita käitumise ja rottide kohta. Käitumuslikke erinevusi täheldati rottidel juba ammu. Selliseid käitumiserinevusi uurides arendati välja mitmed meetodid käitumisparameetrite kirjeldamiseks. Üheks selliseks on ka Otteri poolt kirjeldatud uudiskasti meetod rottide uudistamisaktiivsuse määramiseks. (Otter *et al.* 1997) Meetodi ülesehitus on lihtne. Rott pannakse uudiskasti (koosneb kahest osast: avarväli ja kinnine pesakast) ja jälgitakse tema käitumist 15 minuti jooksul.



Joonis 3: Joonisel on uudiskast. paksema joonega ümbritsetud ala on avarväli, mida rott uudistama hakkab. Parempoolne peenikese joonega kast on pealt kinnine pesakast kuhu rott katse alguses pannakse. Avarväljal on ka 3 objekti: klaaspudel (1), toidugraanul (2) ja puupulk (3).

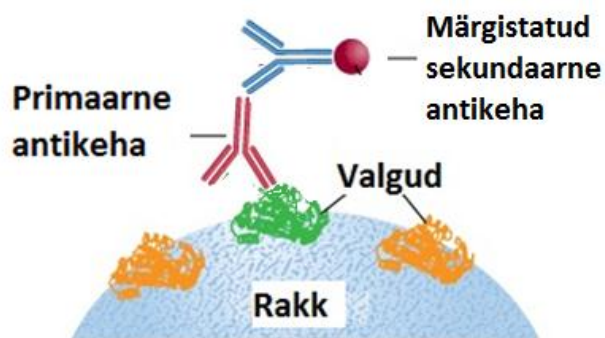
Kuna uudiskasti puhul on tegemist uudse keskkonnaga rotile ongi võimalik jälgida tema uudistamisaktiivsust. Roti vaatluse juures märgitakse üles järgmisel näidud: pesast väljumiseks kulunud aeg, avarväljal veedetud aeg, objektide uudistamine, tõus tagakäppadele ja ületatud joonte arv. Vastavalt saadud tulemustele jagatakse rotid kahte gruppi – HE ja LE. HE – *high exploratory* ehk kõrge uudistamisaktiivsus ja LE – *low exploratory* ehk madal uudistamisaktiivsus. Kõrge uudistamisaktiivsusega rotte iseloomustavad järgmised omadused: aktiivne, uudishimulik. Madala uudistamisaktiivsusega rotte iseloomustab aga arglikkus. (Otter *et al* 1997, Mällo *et al* 2006)

4.7 Immunohistokeemia

Immunohistokeemia põhineb antikeha seondumisel koelõigul paiknevale spetsiifilisele antigeenile, milleks on immunohistokeemia puhul valgu fragmendi struktuur. Ehk siis on immunohistokeemia abil võimalik tuvastada kus asub konkreetne valk. Immunohistokeemia

on kasutusel erinevate valkude (sh G-valk seotud retseptorite) asukoha tuvastamiseks nii koe kui ka raku tasandil, andes olulist informatsiooni retseptorite lokalisatsiooni ja haiguste omavaheliste suhete defineerimisel. Immunohistokeemia ühendab endas kolme erinevat valdkonda: immunoloogia, histoloogia ja keemia.

Antud töös kasutati lokaliseerimisandmeid ka immunohistokeemia meetodil teostatud katsetest. Need andmed on kirjeldatud 2012 aastal Kairi Tõnsau bakalaureusetöös: Orbreseptor GPR155 lokalisatsiooni uurimine immunohistokeemiaga. Kasutatud andmed on saadud järgneva skeemi alusel.



Joonis 4: Skemaatiline ülevaade immunohistokeemia katse toimumise kohta. Uuritavale valgule seostub sinna disainitud primaarne antikeha, millele omakorda seostub sekundaarne antikeha (fluorestsents märgisega). Märgis võimaldab määrata otsitava valgu asukohta ajus.

5. Praktiline osa

5.1 Materjalid

Katseteks kasutatud materjalid on pärit järgmistest allikatest. Riboproovid sünteesis Tõnis Örd Eesti Biokeskusest. Naxo – SSC, PBS, zelatiin ja TritonX-100, AppliChem – PFA, Tris, NaCl ja MgCl₂. Invitrogen – Salmon sperm DNA, Roche – Blocking Reagent (BR), BM purple ja DIG-antikeha. Ferax Berlin –Tween20, KEBO – SDS, Algal Pharma Oy – Pertex, Serva – sahharoos ja Nunc– 12-wellid.

5.2 Riboproovid

GPR155 lokaliseerimiseks roti ajus kasutati GPR155 mRNA-ga komplementaarset RNA proovi (riboproov Antisense - AS) GPR155 geenile. Proovi valmistamisel kasutati kogu GPR155 cDNA ulatust, st ahelad ühinevad vaid juhul kui tegemist on terve retseptoriga, mitte ainult osaga sellest. cDNA eraldamisel teostati ka sekveneerimine veendumaks, et tegemist on ikka soovitud retseptoriga. Saades cDNA õigsuse kinnituse valmistati 2 RNA proovi – Antisense ja Sense. Antisense ehk põhiproov ja Sense ehk kontrollproov. Viimane on komplementaarne Antisense prooviga kuid mitte retseptori mRNA-ga. Riboproovid sünteesis Tõnis Örd.

5.3 Loomade selekteerimine uudiskasti meetodil

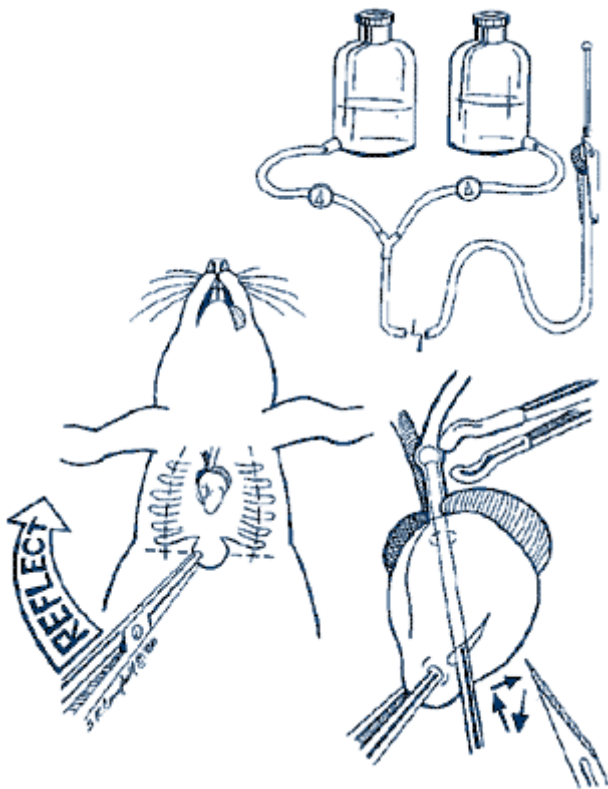
Selekteerimise katsetes kasutati isaseid Wistar liini rotte. Enne katse alustamist viidi katseloomad eraldi ruumi ning lasti neil tund aega ruumiga kohaneda. Kõik loomad kaaluti ja märgistati enne katse algust. Uudistamistesti alguses asetati loom uudiskasti küljes olevasse pesakasti ja jälgiti tema tegevust 15 minuti vältel. Kirja pandi järgmised parameetrid: aeg, mis kulus loomal kõigi nelja käpaga avarväljale tulemiseks, avarväljale ilmumiste arv, väljal asuvate joonte ületmised, tagakäppadele tõusud, väljal tundmatute objektide uudistamiste arv ja kogu avarvälja veedetud aeg 15 minuti jooksul.

Katset korraldati järgmisel päeval. Kahe päeval saadud tulemusi summeerides saadud väärtustest jagati loomad kõrge ja madala uudistamisaktiivsuse järgi. Korraga selekteeriti suurem hulk loomi, mitmeks erinevaks katseks. Seetõttu kasutati analüüsiks kõikide loomade uudiskastist

saadud andmeid. Kõrge uudistamisaktiivsusega loomadel oli objektide uurimisi keskmisel 200 ringis, madalatel aga alla 30. Avarväljal veedetud ajad olid vastavalt 12 minutit kõrge ja 2 min madala uudistamisaktiivsuse korral.

5.4 Ajude perfuseerimine paraformaldehüüdiga ja lõikamine

Loomad pandi sügavasse narkoosi (fenobarbitaal 100mg/kg), looma südamesse sisestati kanüül ning läbi selle lasti kõigepealt Krebs-Ringeri lahust ($118,4\text{mM NaCl}$, $4,7\text{mM KCl}$, $2,52\text{mM CaCl}_2$, $1,18\text{mM MgSO}_4$, $25,01\text{mM NaHCO}_3$ ja $1,18\text{mM KH}_2\text{PO}_4$), et pesta veresoonkonnast ja ajust välja veri. Peale vere väljumist lasti kanüüli mööda roti organismi 4% paraformaldehüüdi lahust.



Joonis 5: Joonisel on roti skemaatiline perfuseerimine paraformaldehüüdiga. Pildi allikas: <http://www.neuroscienceassociates.com/perf-protocol.htm>

Peale perfuseerimist eemaldatakse aju ja viiakse 20% sahharoosi lahusesse ning hoitakse 4°C juures üleöö (või seni kuni aju enam lahuse pinnal ei hõlju). Peale sahharoosi lahuses seismist kiirkülmutatakse aju kuiva jää ja isopentaaniga ning säilitatakse lõikamiseni -80°C juures. Katse päeval lõigatakse ajust mikrotroomiga $40\mu\text{m}$ paksused lõigud. Mikrotroomil kasutatavad parameetrid on -20°C noa ja kambri temperatuur ja -25°C proovi temperatuur.

5.5 *In situ* hübridisatsioon ujuvlõikudel

Ujuvlõikudel teostatav *in situ* hübridisatsiooni katse jaotati kolmele erinevale päevale. Katsete läbiviimisel kasutati järgnevaid lahuseid: fosfaatpuhverdatud soolalahus (PBS), naatriumtsitraadi soolalahus (SSC), Tris-puhverdatud soolalahus (TBST) ja aluselise fosfataasi puhver (NTMT). PBSi kasutati puhverlahusena pH hoidmiseks katsekeskkonnas. SSC-i kasutati hübridiseerimis puhvrina tagamaks samaväärsus erinevate pesuetappide vahel. NTMT-i kasutati kudede tasakaalustamiseks aluselise fosfataasi sadeneva substraadi kasutamise eel. Järgnevalt päevadepõhine lühiülevaade.

Päev 1 - Lõigati 40µm ajulõigud wellidesse (1xPBS jääl). Loputati lõike 1xPBS/0,25% TritonX-100 lahusega 15 minutit ja 5xSSC (pH=5,0) loputati ca 5 min, kõik etapid peale lõikamise viidi läbi loksutil (kõigutil). Peale loputusi viidi lõikudele peale prehübridisatsiooni lahus (MQ, formamiid ja SSC) ja loksutati 65°C juures 1,5h. Prehübridisatsiooni lõppedes alustati hübridisatsiooniga (prehübridisatsiooni lahusele lisati mRNA-proov (1µg/ml), lõhe sperma DNA(10mg/ml) ja 2% blocking reagent) ning inkubeeriti 65°C juures üleöö. mRNA proov oli märgistatud digoksügeniiniga (DIG).

Päev 2 – Loputati, kahe loputusega, ajulõikudelt maha mRNA proovide jäägid: esimene loputus (50% formamiid; 5xSSC pH=5,0; 1% SDS) 30 min 65°C ja teine loputus (50% formamiid; 2xSSC pH=5,0) kaks korda 30 min 65°C. Seejärel loputati kolm korda 1xTBST-ga ja alustati blokeerimisega (2% Blocking Reagent (BR)/1xTBST) 1,5h. Misjärel teostati antikeha inkubatsioon (lahjendusega 1:2000 1xTBST puhvris 1% BR-iga) 4°C juures üleöö. Antikeha oli konjugeeritud aluselise fosfataasiga.

Päev 3 - Pesti ajulõikudelt maha antikeha inkubatsiooni jäägid (1xTBST 3 korda 5min ja 2 korda 1h) ja tasakaalustati lõigud NTMT puhvriga (100mM Tris-HCl pH=9,5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 0,1% Tween20) 2x 10 min. Digoksügeniiniga märgitud mRNA tehti nähtavaks BM – purple'iga. BM-purple lahus on aluselise fosfataasi sadenev substraat. Lahus pipeteeriti lõikudele ja jäeti 24h toatemperatuurile inkubeerima. Peale värvireaktsiooni ilmumist loputati (1xPBS) ning kanti lõigud 0,5% zelatiini lahusega mikroskoobi klaasidele, lastakse kuivada ja kaetakse mikroskoobi slaidid katte meediumiga (Pertex) ning asetatakse peale katteklaasid.

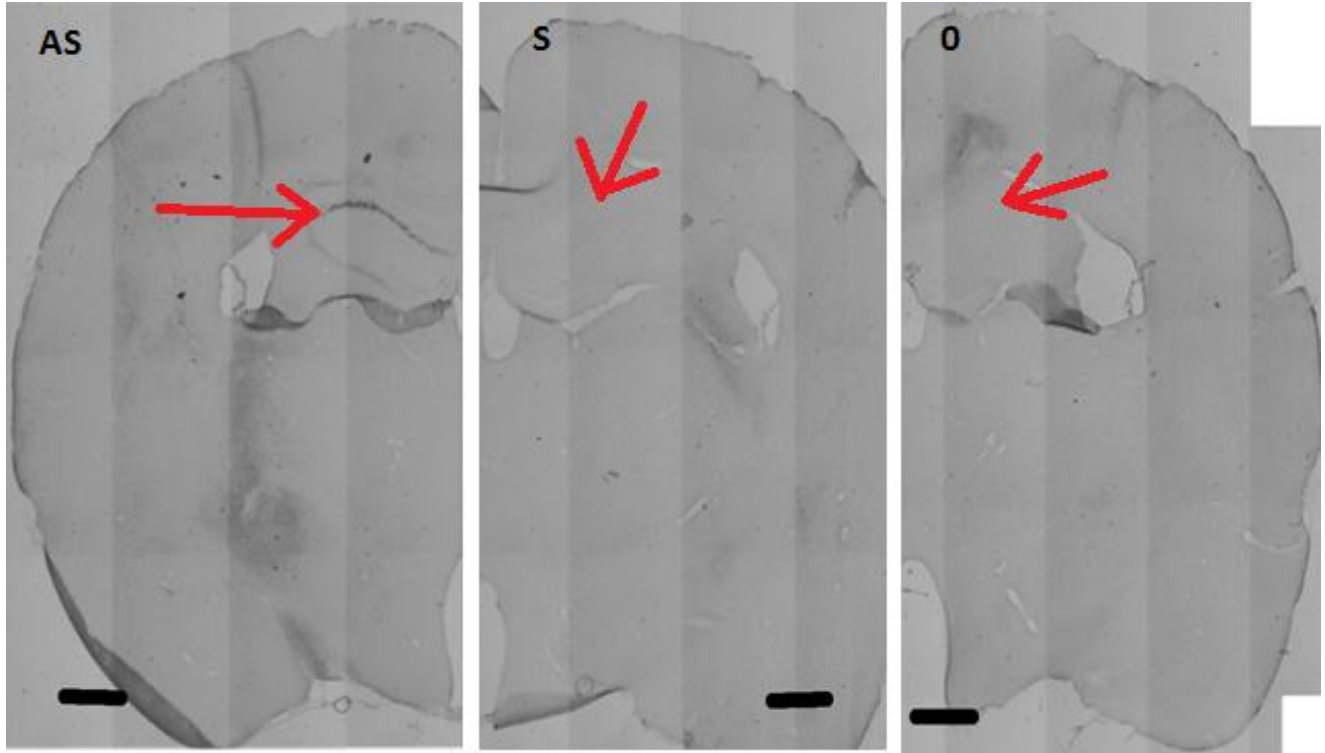
Valmis preparaate vaadeldi TILL Photonics HCS (high content screening) mikroskoobiga ja pildistati Andor Clara DR-02181 kaameraga, kasutati 4x suurendusega objektiivi. Peale

ajulõikude pildistamist vaadeldi ja vajadusel töödeldi saadud pilte programmidega ImageJ ja GIMP2.8.0. Ajupiirkondade täpseks tuvastamiseks kasutati Paxinos'e ja Watson'i „The Rat Brain In stereotaxic coordinates“ ajuatlast. (Paxinos ja Watson 1998)

6. Tulemused

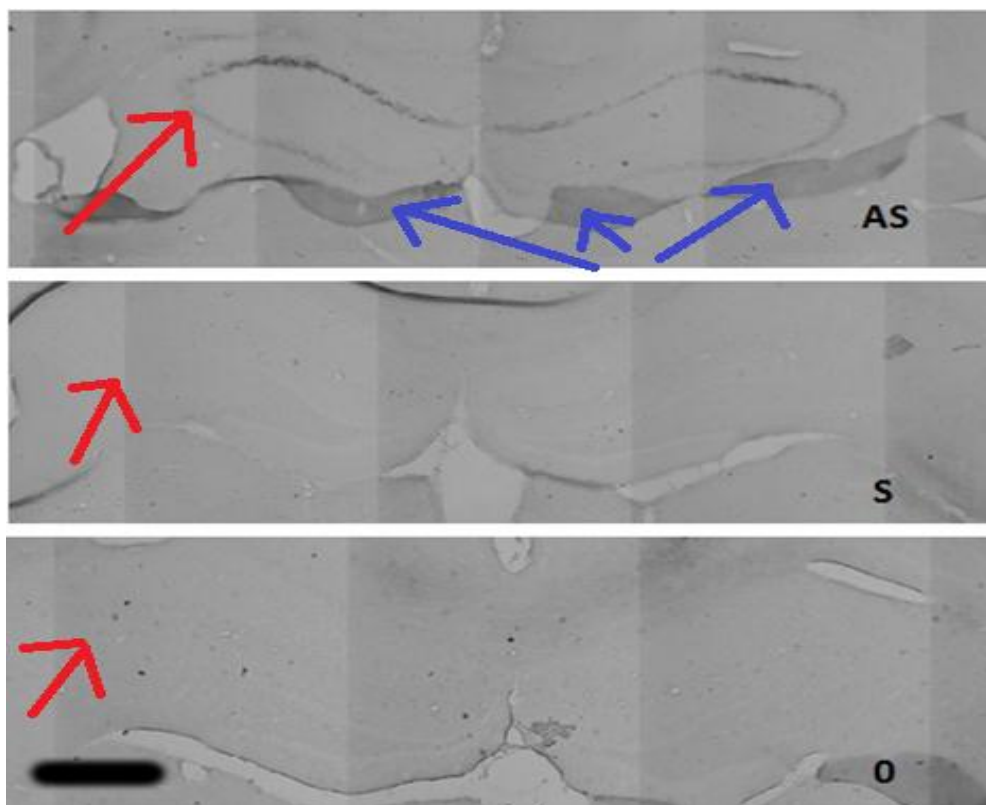
6.1 Kontrollkatse

Enne kogu roti aju skanneerimist teostasin sünteesitud riboproovide kontrollkatse. Eesmärgiks oli veenduda, et tulemusi annab ainult Antisense proov. Proovide kontrolli katse tulemused olid järgnevad.



Joonis 6: Vasakult vaadates Antisense (AS), Sense (S) ja O-proovid (0). nähtava märgistuse andis AS-iga tethud katse. Antud lõikude puhul vaatlesin hipokampuse märgistust (punane nool). Skaala 1mm.

Järgmisel joonisel (7) on toodud hipokampuse ala suuremana kui üldpildil (joonis 6).

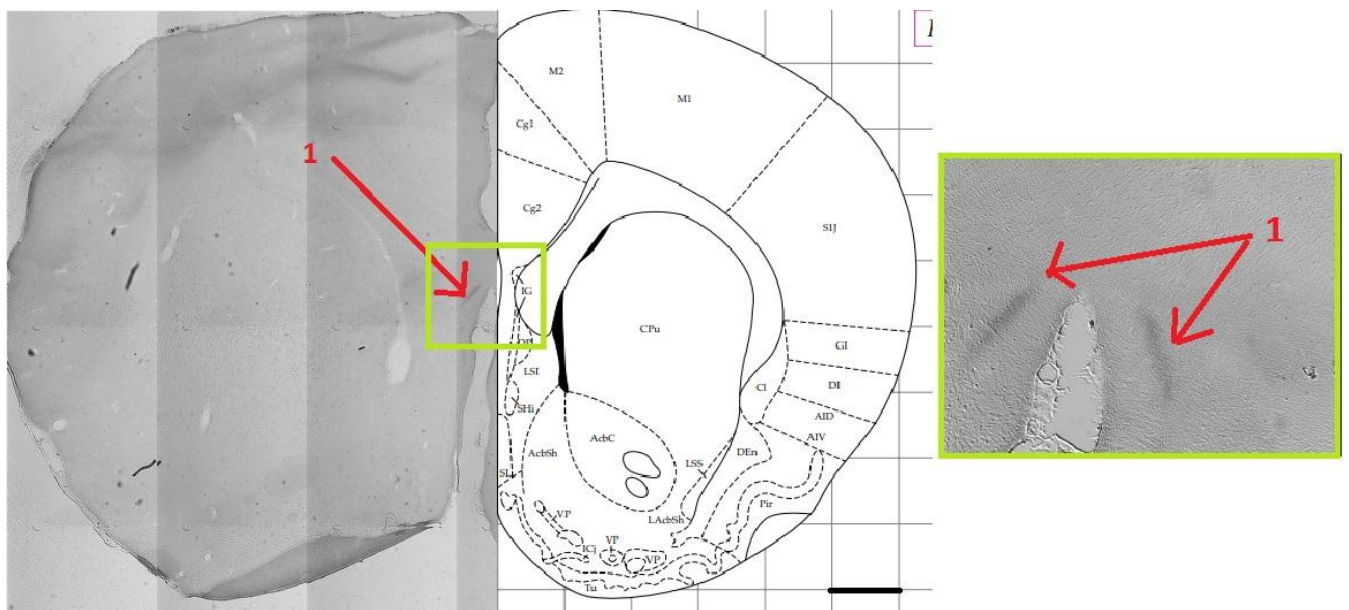


Joonis 7: Hipokampuse (punane nool) ala suuremalt. AS proovi korral on näha märgistus hipokampuse alal, S ja 0 proovide korral märgistust näha pole. Sinised nooled tähistavad ajulõikude kattumist/volte. Skaala 1mm.

Esiõlgse katse põhjal, mis sai sooritatud kontrollimaks, kas sünteesitud riboproovid töötavad, võib järeldada, et riboproovid on töökorras. Samas ilmnes ka ajulõikude klaasidele kandmisel mõningate voltide/kattumiste teket, joonisel 7 on viimane tähistatud siniste nooltega. Antisense riboproov andis konkreetse märgistuse, mida oli ka oodata.

6.2 Sõelung läbi kogu roti aju

Järgnevate katsetega sooritati sõelung läbi kogu roti aju lõigatud proovidele ja antud tulemustest toon välja vaid antisense prooviga tehtud osa. Teised proovid (Sense ja 0-proov) olid kontrolliks. Vähesel määral esines märgistust nii juttkehas, *corpus callosum*, *anterior commissure*'s, väikeaju kurdudes ja mõnedes väiksemates ajuosades. Kõige selgepiirilise märgistus esines aga hipokampuse alal. Järgmiste jooniste peal on näha nii lokalisatsiooni tuvastust kui ka asukohta roti ajus. Piltidele on lisatud väljavõtted Paxinos ja Watson ajuatlasest.



Joonis 8: Eesaju. GPR155 lokalisatsiooni on näha *indusium griseum*'is (1). Rohelise kastiga ümbritsetud piirkond on paremal pool toodud välja suuremana. Skaala 1mm



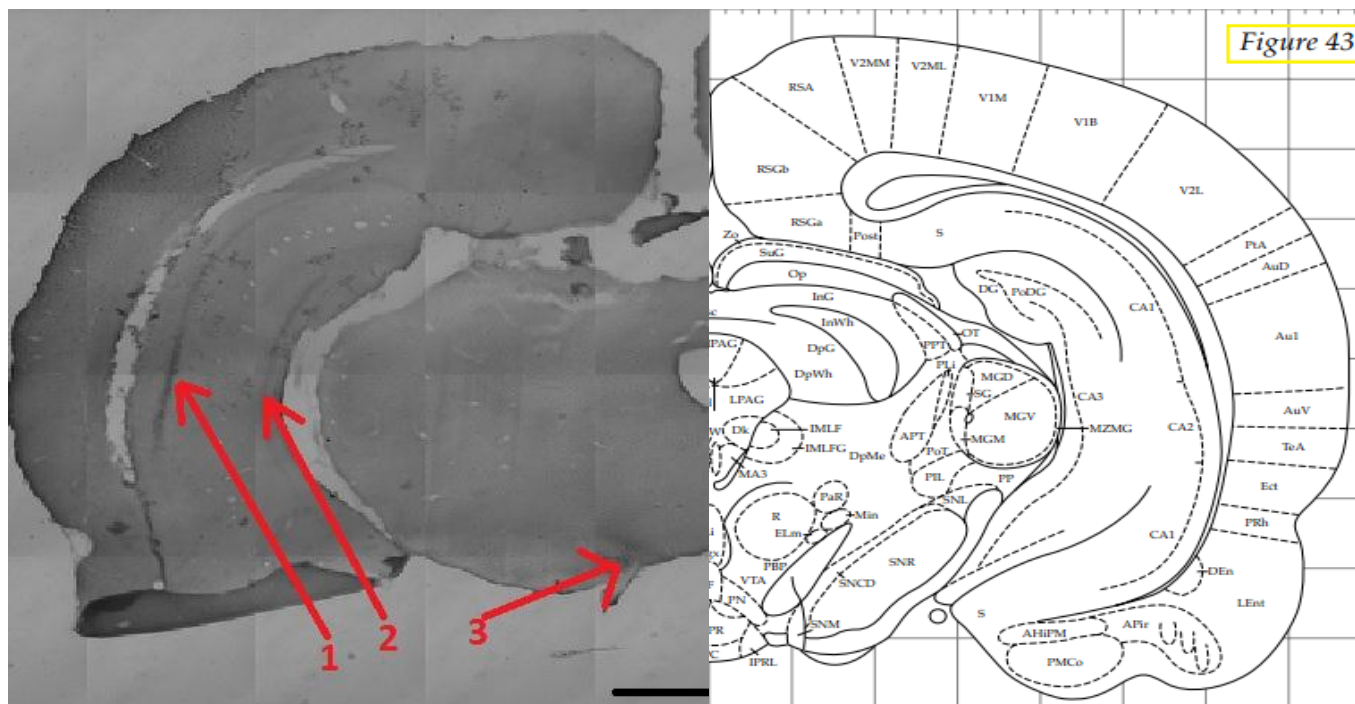
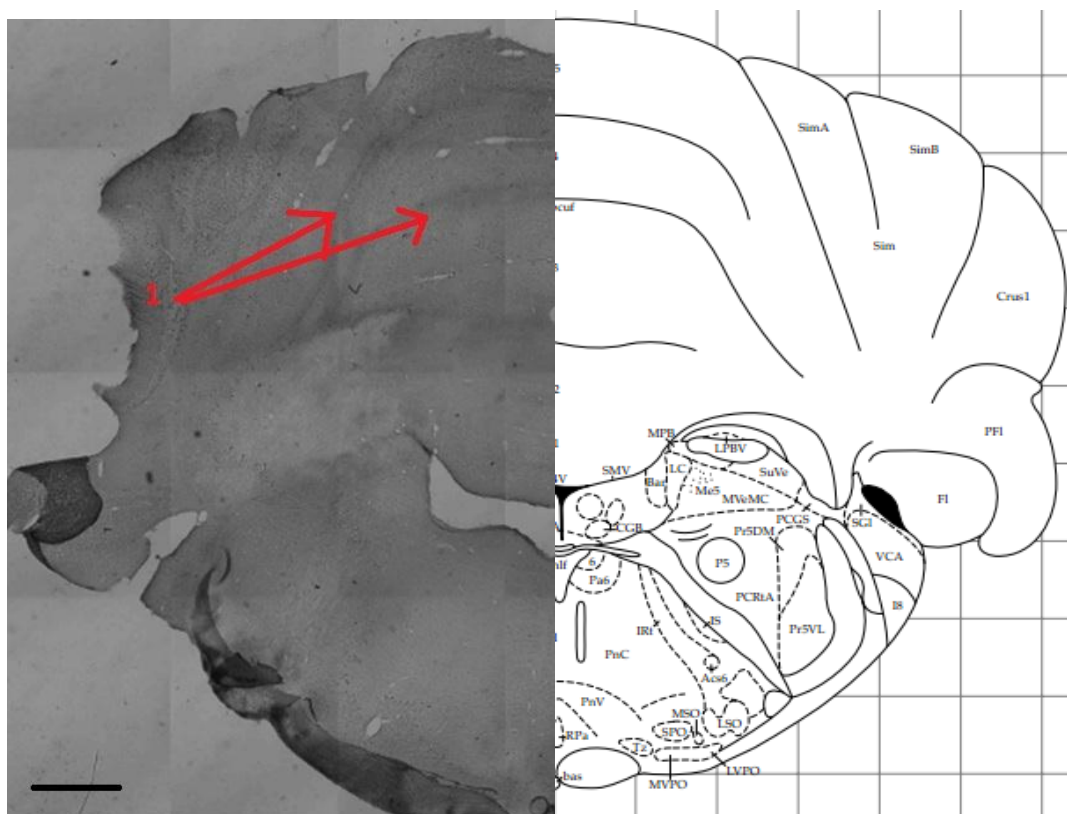


Figure 43

Joonis 11: Keskaju. Joonisel on näha märgistust hipokampuse tagumises osas (1,2) ja mammillary peduncle(3)



Joonis 12: Väikeaju. Joonisel on näha märgistust väikeaju kurdudes (nooled 1). Skaala 1mm.

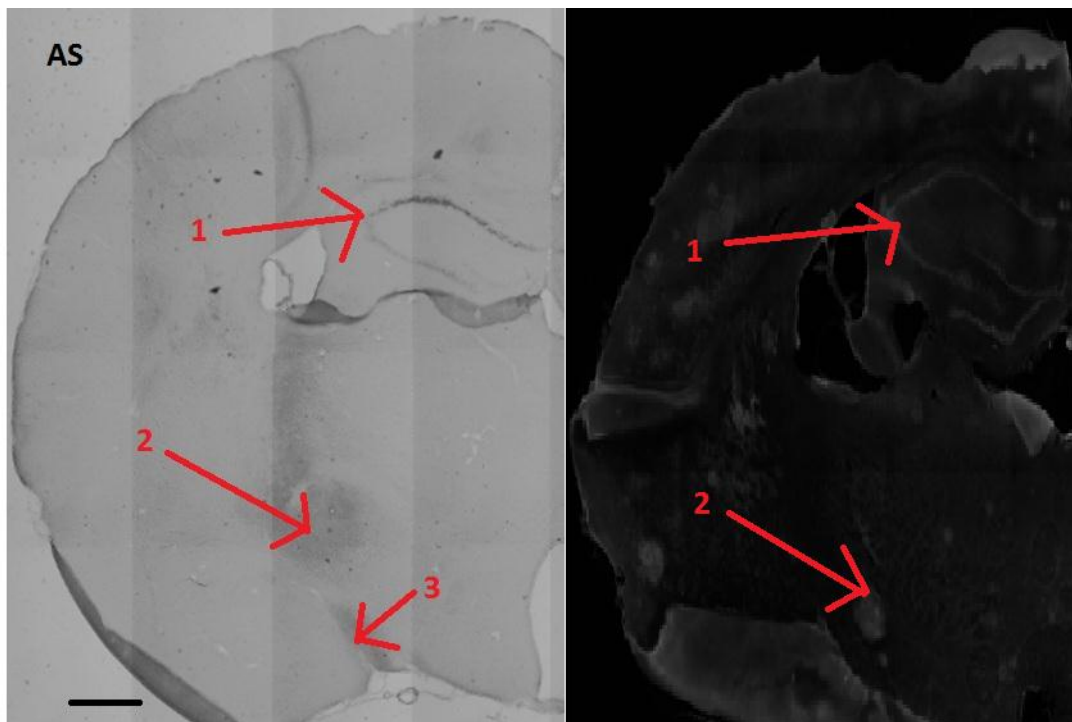
Katses tuvastatud GPR155 mRNA lokaliseerimise esines roti ajus. Kõige selgepiirilisevalt oli lokaliseerimine tuvastatav hipokampuses. Hipokampus on seotud erinevate mälu protsessidega vahendamise (Eichenbaum 2004), millest võib järeldada, et ka GPR155 osaleb mingel radas nendes. Märke GPR155 lokaliseerimisest leidis ka väikeaju kurdudes, ajukoors, *globus pallidus*'es, *indusium griseum* ja optilises juhas.

6.3 Võrdlus Immunohistokeemiast saadud tulemustega

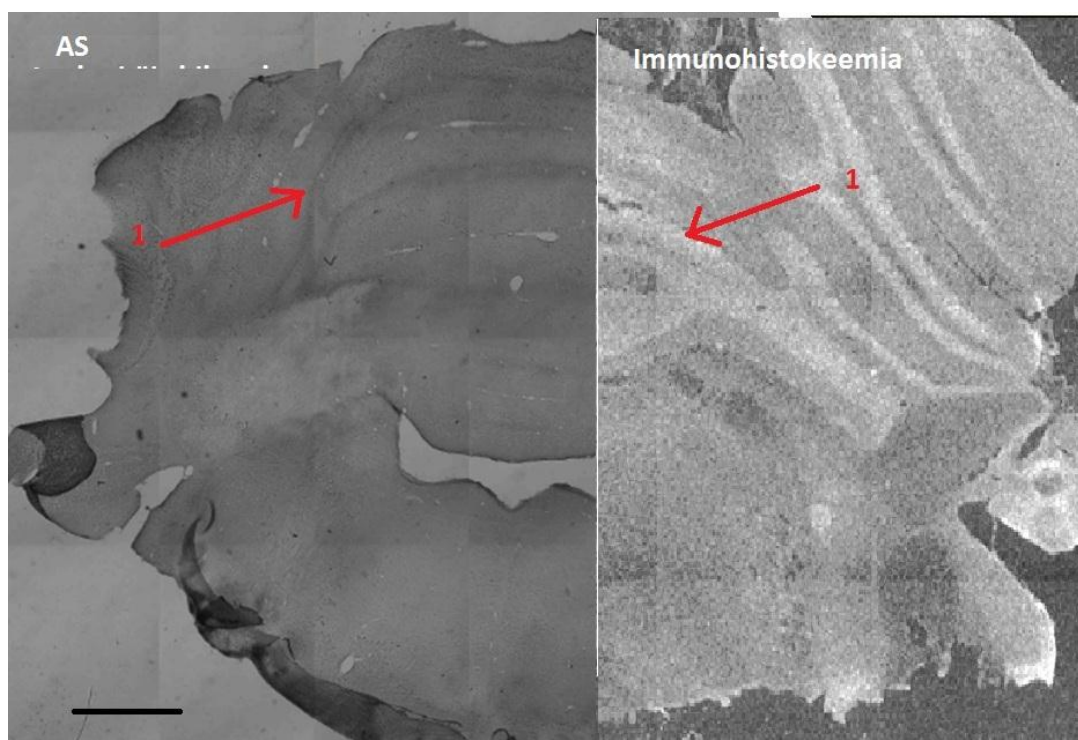
Samuti teostasin GPR155 mRNA ja immunohistokeemia põhjal tehtud lokaliseerimise võrdluse. Joonisel 11 on toodud võrdluseks kõrvuti eesajus asuvad juttkeha piirkond ja ajukoor. Immunohistokeemia puhul esines tugevat märgistust nii juttkehas kui ka ajukoos, *in situ* hübridisatsiooni korral oli märgistus juttkehas vaevumärgatav.



Joonis 13: Joonisel on toodud *in situ* hübridisatsiooni ja immunohistokeemia võrdlus. Vasakul hübridisatsioon, paremal immunohistokeemia. Tegemist on eesaju piirkonnaga. Noolte 1 (ajukoor) ja 2 (juttkeha) juures on immunohisto. korral näha märgistust, *in situ* korral aga mitte. noolte 3 (*indusium griseum*) korral on aga mõlema meetodi korral näha märgistust – järelikult on olemas nii mRNA kui ka valk. Skaala 1mm.



Joonis 14: Joonisel on toodud in situ hübridisatsiooni ja immunohistokeemia võrdlus. Vasakul hübridisatsioon, paremal immunohistokeemia. Tegemist on keskaju piirkonnaga. Kõige selgepiirilise määrgistus on mõlema meetodi korral hipokampuse alades (1), *in situ* hübridisatsiooni ja immunohistokeemia korral on määrgitust näha ka kahvakeras (*globus pallidus*) (2) ja optilises juhas (optic tract)(3). Skaala 1mm.



Joonis 15: Joonisel on toodud in situ hübridisatsiooni ja immunohistokeemia võrdlus. Vasakul hübridisatsioon, paremal immunohistokeemia. Tegemist on väikeaju piirkonnaga. Mõlema meetodi korral on näha määrgitust väikeaju kurdudes (1). Skaala 1mm.

Nii immunohistokeemia kui ka *in situ* hübridisatsiooni katse kinnitasid GPR155 mRNA leidumist hipokampuse alal (Joonis 13). Mõlema meetodiga saadud tulemuste kokkulangevusel võib järeldada, et hipokampuse aladel leidub nii GPR155 mRNA-d kui on ekspresseeritud ka retseptor. Samasuguse asukohaga märgistust andsid ka väikeajus asuvad kurrud (joonis 14). Samas aga ei näidanud *in situ* hübridisatsioon GPR155 mRNA-d juttkehas ja *pararubral nucleus*, kuid immunohistokeemia näitas.

6.4 GPR155 lokalisatsiooni erinevused kõrge ja madala uudistamisaktiivsuse korral

Meist mitte tulenevatel põhjustel ei olnud võimalik saada korralikke proove analüüsimeks GPR155 mRNA lokalisatsiooni kõrge ja madala uudistamisaktiivsusega loomadel. Loomadelt eraldatud ajusid ei fikseeritud paraformaldehüüdis ja sahharoosis, enne kiirkülmutamist, mistõttu lõikamisel lõigud lagunesid.

7. Arutelu

Käesoleva magistritöö raames teostatud katsete eesmärgiks oli orbretseptor GPR155 lokalisatsiooni uurimine *in situ* hübridisatsiooni meetodil roti ajus. *In situ* hübridisatsiooni teostamiseks disainiti GPR155 cDNA vastu riboproov. Riboproovi õigsust kontrolliti sekveneerimise teel. Sekveneerimine kinnitas eraldatud proovi õigsust. Riboproov märgistati digoksügeeniiniga, see võimaldas riboproovi asukohta hiljem proovides tuvastada.

In situ hübridisatsiooniga saadi infot GPR155 lokalisatsiooni kohta järgmistes piirkondades: hipokampus, ajukoor, väikeaju, veejuha ümbruses, *globus pallidus*, optiline juha ja *indusium griseum*. Kõige selgepiirilisemalt oli lokalisatsioon tuvastatav justnimet hipokampuses ja väikeajus.

Töö käigus võrreldi saadud tulemusi ka immunohistokeemia meetodit kasutades saadud tulemustega. Immunohistokeemiast saadud tulemused ühtisid *in situ* hübridisatsiooni omadega järgmistes ajuosades: hipokampus, ajukoor, väikeaju, *indusium griseum*, *globus pallidus*. Kuid immunohistokeemia tuvastas GPR155-i ka juttkehas, *pararubral nucleus's* ja keskse veejuha ümbruses.

Antud töös tuvastati kõige kõrgem ekspressioon väikeajus ja hippokampuses. Väikeaju seostatakse motoorikaga, kuid ta osaleb ka iseloomu ja tujude mõjutamisel. Hipokampus aga on seotud emotsioonide, ruumitaju ja mäluprotsessidega.

In situ hübridisatsiooni ja immunohistokeemia meetodidel saadud tulemused on kokkulangevad mõnedes ajuosades. Tulemuste täpsuse kohapealt peaks eelistama pigem *in situ* hübridisatsiooniga saadud andmeid kuna meetod ise tuvastab kogu GPR155 RNA-d, immunohistokeemia puhul aga tuvastatakse osa GPR155-le vastavast valgust.

Töö käigus tuli välja ka koeproovide spetsiaalse eeltöötamise olulisus. Käitumiskatsetes mitte osalenud loomade ajud fikseeriti paraformaldehüüdi ja sahharoosiga. Ilma fikseeriva eeltöötamiseta koeproovid lagunesid aga enne katse algust (peale mikrotoomil lõikamist katsepuhvrisse viimisel).

8. Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida orbretseptori GPR155 lokaliseerimist terve roti aju ulatuses. GPR155 mRNA paiknemine ajus tuvastati in situ hübriidiseerimise abil, tulemusi võrreldi vastava valguga lokaliseerimise määramise tulemustega immunohistokeemia abil.

Katsete tulemusena leiti GPR155 mRNA-d hipokampuses, väikeajus, ajukoores, veejuha ümbruses, globus pallidus's, optilises juhas ja indusium griseum's. Kõige selgepiirilise lokaliseerimise saadi hipokampusest ja väikeajast.

Antud tööst saadud tulemusi kinnitas võrdlus sama orbretseptori valguga lokaliseerimise immunohistokeemiliste uuringute tulemustega. Mõlema meetodiga leiti GPR155-te hipokampusest ja väikeajast. In situ hübriidiseerimisel saadud tulemused võiksid olla täpsemad kuna RNA-proovi seostumine on kõrgema spetsiifilisusega kui antikeha seostumine. RNA tuvastamisega.

Töö tulemusena kirjeldati GPR155 mRNA esinemine erinevates roti ajupiirkondades.

9. Kasutatud kirjandus

- Albuquerque SS, Carret C, Grosso AR, Tarun AS, Peng X, Kappe SH, Prudêncio M, Mota MM. (2009) Host cell transcriptional profiling during malaria liver stage infection reveals a coordinated and sequential set of biological events. *BMC Genomics*. 10:270.
- Braissant O, Wahli W. (1998) A Simplified *In Situ* Hybridization Protocol Using Non-radioactively Labeled Probes to Detect Abundant and Rare mRNAs on Tissue Sections. *Biochemica*. 1:10-16
- Civelli O, Saito Y, Wang Z, Nothacker H-P, Reinscheid R.K. (2006) Orphan GPCRs and their ligands. *Pharm. & Therap.* 110: 525-532
- Eichenbaum H. (2004) Hippocampus: Cognitive Processes and Neural Representation that Underlie Declarative Memory. *Neuron*. 44:109-120
- Farquharson M, Harvie R, McNicol A.M. (1990) Detection of messenger RNA using a digoxigenin end labelled oligodeoxynucleotide probe. *J Clin Pathol* 43:424-428
- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*. 63(6):1256-72.
- Hacker E, Muller K, Whiteman DC, Pavey S, Hayward N, Walker G. (2008) Reduced expression of IL-18 is a marker of ultraviolet radiation-induced melanomas. *Int J Cancer*. 123:227-31.
- Hart S.M., Basu C. (2009) Optimization of a Digoxigenin-Based Immunoassay System for Gene Detection in *Arabidopsis thaliana*. *J of Biomol Techniques*. 20:96-100
- Im D-S. (2002) Orphan G Protein-Coupled Receptors and Beyond. *Jpn. J. Pharmacol*. 90:101-106
- Mällo T, Alttoa A, Kõiv K, Tõnissaar M, Eller M, Harro J. (2007) Rats with persistently low or high exploratory activity: Behaviour in tests of anxiety and depression, and extracellular levels of dopamine. *Beh Brain Res*. 177: 269-281.
- Neumann J-M, Couvineau A, Murail S, Lacapere J-J, Jamin N, Laburthe M. () Glass-B GPCR activation: is ligand helix-capping the key? *Trends in Biochem. Sciences* 33(7):314-319

Nishimura Y, Martin CL, Vazquez-Lopez A, Spence SJ, Alvarez-Retuerto AI, Sigman M, Steindler C, Pellegrini S, Schanen NC, Warren ST, Geschwind DH. (2007) Genome-wide expression profiling of lymphoblastoid cell lines distinguishes different forms of autism and reveals shared pathways. *Hum Mol Genet.* 16(14):1682-98.

Oh DY, Kim K, Kwon HB, Seong JY. (2006) Cellular and molecular biology of orphan G protein-coupled receptors. *Int Rev Cytol.* 252:163-218.

Otter MH, Matto V, Soukand R, Skrebuhhova T. (1997) Characterization of rat exploratory behavior using the exploration box test. *Meth Find Exp Clin Pharm.* 19: 683-691.

Paxinos G. and Watson C. (1998) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 4th ed. Academic Press, San Diego.

Trifonov S, Houtani T, Hamada S, Kase M, Maruyama M, Sugimoto T. (2009) *In situ* hybridization study of the distribution of choline acetyl transferase mRNA and its splice variants in the mouse brain and spinal cord. *Neuroscience* 159:344-357

Trifonov S, Houtani T, Shimizu J-i, Hamada S, Kase M, Maruyama M, Sugimoto T. (2010) GPR155: Gene organization, multiple mRNA splice variants and expression in mouse central nervous system. *Biochem and Biophys Res Com* 398:19-25

Trifonov S, Houtani T, Kase M, Toida K, Maruyama M, Yamashita Y, Shimizu J-i, Sugimoto T. (2012) Lateral regions of the rodent striatum reveal elevated glutamate decarboxylase 1 mRNA expression in medium-sized projection neurons. *Eur J. Of Neuros.* 35:711-722

Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, Brown A, Rodriguez SS, Weller JR, Wright AC, Bergmann JE, Gaitanaris GA. (2003) The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(8):4903-8.

Ma P, Zimmel R. (2002) Value of novelty? *Nature reviews-Drug Disc.* 1:571-572

Viidatud projekti Newmood andmed: RNA hübriseerimine toimus kompaniis ServiceXS Hollandis, Andmed normaliseeris ja statistilise andmeanalüüsi tegi Tim Hinsley Manchesteri ülikoolist.

http://www.genscript.com/cgi-bin/orf/refseq.pl?acc=NM_001107811 viimati alla laetud 22.05.2013

10. Localization of orphan receptor GPR155 in rat brain with *in situ* hybridization

Kaieli Tohvert

Summary

The aim of this study was to determine the localization of orphan receptor GPR155 in rat brain with *in situ* hybridization.

In situ hybridization is based on complementary RNA binding to the GPR155 mRNA. RNA probes are labeled with digoxigenin, which is later visualised by digoxigenin-binding antibody, which is conjugated to alkaline phosphatase.

Localization of GPR155 mRNA was found in these areas: hippocampus, cortex, around aqueduct, globus pallidus, optilic tract and indusium griseum. The strongest localization of GPR155 mRNA was found in following areas: hippocampus and cerebellum. Results from this work were also compared to results from localization fo GPR155 protein by immunohistochemistry.

As a result of this work GPR155 localization was described in different rat brain areas..

11. Lisad

1	aggtaccg	cgcagacgc	ctaaggtagc	tgacaggccc	gcagcggtc	acccctccct
61	tttctcgga	cgtggttggg	catctgctgc	tggctcaagc	ctttagaaga	gggtcccg
121	caggagatga	cggcagtggt	ctcgtgctgc	agtccctctgc	gagcaccggc	ttccttctcc
181	tcgcagccgg	agctgcaaac	ctagcagaga	ccagtctgga	agtacaggga	gagggaagat
241	ggattcttat	ttcccagcaa	agaaactcaac	tcttgctgtt	aatatgaatg	agactttgtc
301	tgccagtc	ggctttaatt	ccaccagtg	cccacctccg	atgtcaataa	ccaggctctt
361	cccagcgta	ctcgagtgt	ttggcatcgt	cctttgtggg	tacatagcgg	gaagggccaa
421	tgtcataaca	tccacacagg	ccaaaggact	gggaaacttc	gtctccagat	tgcctctccc
481	agctttatta	ttcaaaaaca	tgggtgtgct	taattttgcc	aatgtggatt	gggtttttct
541	atatagcatc	ctaattggca	aggcctcgt	attttctcgt	gtatgcgtgt	taaccctggt
601	ggttgccagt	cctgagagtc	gatttagcaa	agctggactg	ttccctatct	tgtctacaca
661	gagcaatgac	tttgctttgg	gataccctat	agttagaagc	ctgtaccaaa	ccacatcccc
721	agaatatctc	cagtacattt	atgttggtggc	accaatatct	cttatgatgt	taaaccttat
781	aggtttcatc	ttctgtgaaa	ttccagaagtc	aaaagacact	cgaaatgctt	tcacaaacaa
841	agcaaaaatt	gtgggacttg	gattcctgcg	cgtgttacag	aaaccgatag	tgtttaaggt
901	cttcgttggc	atcgccttca	attttattct	tgaataaaaag	atccctgtgt	atatggaaaa
961	ttttcttgat	gggcttgcaa	actccttctc	tgggtcagcc	ctgttctatc	tcggtctgac
1021	catggtagga	aaaatcaggc	ggctgaagaa	gtcggcgttc	gtggcgctca	tgtcctcat
1081	cacagctaaa	ctcctggtgc	tgccccttct	gtgcagagaa	atggtggaag	tctgtgacaa
1141	gggtaacagc	gtagtgaacc	acacgagctc	gtccaaactat	gcgtttctct	atggcgtctt
1201	ccctgtggct	ccaggagtgg	ctatctttgc	aacacaattc	aaatggaag	tggagatcat
1261	aacctcagga	atggtcataa	gtacatttgt	gtctgtccca	atcatgatg	ttctgtcgtg
1321	gttttgacc	tttctacca	ggatgtgtta	gccactggca	tatgccattc	agaaatgtag
1381	ctttgacata	agcattatca	gcctggtctc	cttgatctgg	tctctgtctg	ttcttctctt
1441	gagtaagaag	tataagcagc	ttcctcacat	gctcacagct	aacctactca	tcgctcagac
1501	tattgtttgc	gctggaatgg	tgatatggaa	ttttgtttaa	gaaaaaaatt	ttgttggaca
1561	aatttttggg	tttgttttat	tgtacagctc	cctgtacagc	acctatctat	ggacggcct
1621	tctagcagtt	tctttgtttc	ttttaaagaa	gcgggagagc	gttcagatcc	cagtgggcct
1681	catcatcata	tctggctggg	gaatccctgc	tctcctcgtg	ggcgtgcttc	tgataactgg
1741	aaaaacacag	ggagacagcg	tgtactggcg	ttctctttat	ggaaaagagc	agatgatcac
1801	cacagcagtc	accctgttct	gcagcattct	catagctggg	gtgtcactca	tgtgcataga
1861	ccgtaccacc	caagctggcc	actacgaagg	tttccggccag	tctcagagtc	acaaaccggt
1921	agagcctgga	agcactcgtg	tcgaggagag	cccagcgcca	acaagtgaac	cagagctctt
1981	cccaagtctc	atcccagaaa	cagggtgctg	ttcttgctcc	ttgggaaatg	gtgaattacg
2041	ctgtccatca	atcacgcccag	gaacgaactc	aagtgttagc	aggcctaggc	cttcttctt
2101	tgagaaaacc	gaccagtgtg	tgaacccgtg	tgaactccag	agctgcattc	tcgcccagga
2161	agaagagcag	tacctgcaga	gtggagaccc	gcagctgacc	cgtaacgttc	tgtgtgcct
2221	cgctcctcat	atcggcctgt	ttgttaattc	ctctagctgt	ctctggtggc	tctttaacca
2281	cgagacagga	cggtctctacg	ttgaattaca	gtttttctgt	gctgtgttta	actctggcca
2341	gggattttat	tccctcggaa	tttttgggtt	ggacaaacat	ctaatcatcc	taccttcaa
2401	aagaaggctt	gaattcctgt	ggaaacaata	agaaacagca	gaagacagag	aatcccgggt
2461	ttccgaggaa	ataaaaaatga	cctgtcaaca	gtttgtacat	tatcaccgtg	acctgtgcac
2521	ccgaacacat	ctcagagaaa	gaaggtgtgg	tgcaaaagac	tctgcgggga	cttctgtggg
2581	ctgtgacctg	gtgaactggc	tcatcgaagt	cggcctagct	tctgaccgtg	gcgaagctgt
2641	gatctatgga	gacagactgg	tgaaggggg	agtcatccag	catatcacca	atgaatatga
2701	gtttccggag	gagtatttgt	tttaacagat	tcttcaaaaag	agtcctgaac	ggagtcctcc
2761	tgcgggcact	gtaagcaacc	ccccagaaga	aagctataaa	gaaattgggtc	acgctctcc
2821	gcccctcactc	tcccctaaga	cttaagatcc	agagagagcc	ccgcaggacc	acaccctcta
2881	gcctcaaatc	tgtatctttt	actgtgggga	ccctgggcag	gtcatctctt	atgtaaaatg
2941	acaaaggcaa	tccctaccttg	tactgacatc	ccataacttt	acgtgtctat	agagcacata
3001	ggaaactgac	aagagatttc	acaaagttaa	aggttatgat	aatgaataca	gcagttgcta
3061	gataaccac	tgctgtccca	acatttttaa	aatcatctct	ttctgaaact	gttatctatta
3121	tagagtcagt	atccagctgg	ctgtgatttt	aagttgcca	atgtggcagg	tttgcctctc
3181	tcaaaaggaa	ccttaggaca	acctcacatt	tatcaataac	acttcccccc	aacagatttt
3241	tacttattct	agtaaaaagct	tttattttcc	ttcccacttc	tttgacaaat	actacctatt
3301	cgaaaaattac	aactactggt	ctgtttttga	gccaaggctc	catgatgtag	ccaggctggg
3361	cctcaaatcc	ctatgtagcc	aggaatggtt	tttaactact	gatcttctctg	cctctgccta
3421	ctgagttctg	gactttttgg	tgtgtgccaa	catgcccggc	taaccccgat	atttttttta
3481	agtaattttt	aaattttatt	ttgataaaaac	accagttttt	aaggtttttg	tcttttcttg
3541	ttttctatct	acattacaaa	tgtgtaccaa	taagaagaga	ataagaacat	tactatctct
3601	ataatctttt	aagataaaaa	ttttaataaa	tttgaactta	ttcattttaa	tgttatttaa
3661	gaaataaatg	caagcaatgt	actgtttctg	atagaagaaa	aatccacttt	attcccctga
3721	ttgagaaagt	atatagtcag	gaacttaaaa	ttctaagcct	agcaacctac	cttagaattt
3781	agtcctttct	gtgtccatgt	ctaaaaaatc	tgt aagttta	aaaattagta	agtgttgctt
3841	agtcctatga	gatttttagga	cagaatgaca	ggaacacaa	tagttactaa	gcaacaggga
3901	ggcttccctta	cagatctggg	gctggcagtg	caagggtaaa	cagctgcact	ccacctctgc
3961	tgaggccctc	gcaggtccac	caccctcgat	gggagctgcc	ctcggtggga	gggaaggggt
4021	ctggaagaac	aaaccgcatg	ttggcacctc	ttctctcatg	agccacactt	ctccagggtca
4081	cctccctggg	gttgggtttt	gaagagacat	gtccagacca	ttacagcctc	aggtaaagct
4141	ttattctcag	agaatttgca	catcctttga	acagctactt	aatatttaga	tatcagtgat
4201	ggttttaact	attctaaatg	ttattttatc	tatttttagt	tttcataat	aaaagccatt
4261	taggaaatta	tttatagggt	ttagtccctg	gcccttctaa	tgtagcaaat	acataaatt
4321	aagaaaaact	tgcattggaag	cctagtgtat	ataaaaagaa	atgatgttta	ttttatgtta
4381	caatcatgga	agcgggatgt	tttaggtaga	actatagcac	cataaaaact	aggggaaaaa
4441	agagacacgc	tcacactgta	ctccttaggg	ccaagggtac	acataagccc	ccgcttagc
4501	agcctccagt	agcaagacaa	aattcacatg	tatgcgggca	actcaaatcc	aagcgaggga
4561	atctgttctg	tttatgaata	acccatatta	actatgctct	ttcatttgca	caagtgggaat
4621	ctgaaacatc	attgtctgtg	ggaggctcta	agagagaacc	atagatcaga	tgactcgca
4681	gtttcagatg	ataaaggcgt	actttctcac	tcttaggagt	aaggataagg	taattttatt
4741	aaaggaaatg	tttgatgttt		tgacagcagc	tttctcaata	aaatacctat
4801	tttaacttgc					

Lisa 1: GPR155 geeni järjestus

12. Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Kaieli Tohvert

(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: 01.03.1988)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Orbretseptor GPR155 lokalisatsiooni määramine roti ajus *in situ* hübridisatsiooni abil,

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on Ain Uustare,

(*juhendaja nimi*)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus/Tallinnas/Narvas/Pärnus/Viljandis, **pp.kk.aaaa**

Tartus 23.05.2013